



线粒体柠檬酸检测试剂盒

MCA Assay Kit

可见分光光度法

产品编号: AK407V

产品规格: 25T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES407-1	50mL×1 瓶	4℃保存;
ES407-2	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK407-A	15mL×1 瓶	4℃保存;
AK407-B	5mL×1 瓶	4℃保存;
AK407-C	粉剂×1 瓶	临用前加入 15mL 蒸馏水充分溶解待用; 剩余试剂 4℃保存。
AK407-S	1mL×1 支	(10μmol/mL 柠檬酸标准液) 4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 线粒体柠檬酸 (Mitochondrion citric acid, MCA) 是线粒体三羧酸循环的第一个中间产物, 由柠檬酸合酶催化乙酰CoA 与草酰乙酸合成, 其含量是三羧酸循环强度的主要指标之一。配合测定丙酮酸含量、丙酮酸脱氢酶活性、乙酰CoA 含量、柠檬酸合酶活性和CA含量, 其中 (1) 丙酮酸含量和丙酮酸脱氢酶活性变化可以反映糖酵解进行程度, (2) 综合分析丙酮酸含量、丙酮酸脱氢酶活性和乙酰CoA含量变化可以反映脂肪酸β-氧化途径提供的乙酰CoA情况, (3) 乙酰CoA含量、柠檬酸合酶活性和CA含量变化可以反映三羧酸循环进行状况。

原理: CA 在柠檬酸裂解酶的作用下, 生成 α-酮酸 (草酰乙酸); 在弱酸性条件下, α-酮酸进一步与苯肼反应, 生成相应的 α-酮酸苯腙; α-酮酸苯腙在 330nm 处有吸收峰, 该波长下吸光度的变化程度可反映出 CA 的含量。

自备用品:

分光光度计、水浴锅、可调式移液枪、1mL 石英比色皿、研钵和蒸馏水。

线粒体中柠檬酸提取:

称0.05~0.1g 样品 (建议称0.1g 样本), 加入0.5mL ES407-1, 冰上充分研磨, 600g/min 4℃离心5min; 取上清至另一EP 管中, 11000g/min 4℃离心10min, 弃上清 (取300μL 该上清液和300μL ES407-2中和后可用于细胞质CA含量测定); 沉淀即线粒体, 向沉淀中加入0.5mL ES407-1, 充分悬浮溶解, 超声波破碎 (功率20%, 超声3 秒, 间隔10 秒, 重复30 次), 取此溶液300μL 和300μL ES407-2中和, 混匀, 置冰上待测 (不可用于蛋白质含量测定)。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 330nm, 蒸馏水调零。
2. AK407-A、AK407-B 和 AK407-C 37℃预热 10min。
3. 样本测定 (空白管和标准管只需要各做一个):

试剂名称	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)
AK407-A	300	300	300
蒸馏水	300		
标准品		300	
样本			300
AK407-B	100	100	100
AK407-C	300	300	300
充分混匀, 330nm 立即测定初始吸光值 A1 和 37℃孵育 30min 后的吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。			

柠檬酸含量计算：

1. 按样本蛋白浓度计算

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)

$$= [C \text{ 标准管} \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 样}] \div (V \text{ 样} \div Cpr)$$

$$= 10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

2. 按样本鲜重计算

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$)

$$= [C \text{ 标准管} \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 样}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总})$$

$$= 10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

注： C 标准管：标准液浓度， $10\mu\text{mol}/\text{mL}$ ； V 样：加入反应体系中样本体积， 0.3mL ； V 样总：加入提取液体积， 1mL ； Cpr：样品蛋白浓度， mg/mL ； W：样本质量，g。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))